CHAPITRE 2.3.2.

BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La bronchite infectieuse aviaire (BI) est due à un coronavirus, le virus de bronchite infectieuse (VBI). Ce virus provoque des infections surtout chez les poulets et est un agent pathogène important des oiseaux de production (viande ou œufs). La BI est une maladie contagieuse aiguë caractérisée principalement par de symptômes respiratoires chez les jeunes oiseaux. Chez les poules on observe souvent une baisse de la production et de la qualité des œufs. Certaines souches de virus peuvent provoquer des néphrites interstitielles et de la mortalité.. La sévérité des infections respiratoires dues au virus de la bronchite infectieuse (VBI) est augmentée lors de la présence d'autres agents pathogènes bactériens entraînant une infection des sacs aériens. L'isolement du virus ou la détection de l'acide nucléique viral à partir des élevages affectés sont indispensables au diagnostic de la BI. La mise en évidence d'une augmentation du taux d'anticorps sériques peut aussi se révéler utile. L'utilisation généralisée de vaccins à virus vivants et inactivés peut compliquer à la fois l'isolement du virus et le diagnostic sérologique de la BI. L'apparition de souches antigéniques variantes peut expliquer l'inefficacité de l'immunité induite par la vaccination.

Le recours au laboratoire est indispensable au diagnostic. L'isolement et l'identification du virus sont les méthodes de choix. Les techniques de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) sont couramment utilisées pour identifier le génotype du VBI. Les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) et les méthodes immuno-enzymatique (ELISA) sont souvent utilisées pour les suivis sérologiques des élevages. On peut aussi associer d'autres tests comme la microscopie électronique, les anticorps monoclonaux, la séroneutralisation virale (SN), les tests immuno-histochimiques ou de fluorescence et les épreuves virulentes après vaccination sur poulets.

***Identification de l'agent pathogène :** pour la forme respiratoire classique, le VBI est le plus souvent isolé avec succès de la muqueuse trachéale et du poumon dans les jours ou la semaine qui suivent l'infection. Pour les autres formes de la BI, les meilleures sources de virus sont constituées par les reins, l'oviducte, les amygdales caecales ou le proventricule selon la pathogénie de la maladie.*

Les embryons de poulets provenant d'élevages exempts d'agents pathogènes spécifiques ou des anneaux de trachée d'embryons sont utilisés pour l'isolement viral. L'inoculation de la cavité allantoïdienne avec le VBI entraîne des embryons chétifs, rabougris avec une dystrophie des plumes et des dépôts d'urate dans le mésonéphros rénal, généralement en moins de trois passages. L'isolement sur anneaux de trachéaux présente l'avantage de permettre l'observation d'une stase des cils trachéaux dès la première inoculation. La RT-PCR est de plus en plus utilisée pour l'identification du génotype de la glycoprotéine des spicules (S) des souches isolées sur le terrain. Le typage génétique sur la base d'amorces spécifiques de la sous-unité S1 du gène S ou le séquençage du même gène donnent, généralement mais pas toujours, les mêmes résultats que le sérotypage par IHA ou la SN. Les techniques sérologiques IHA ou SN utilisant des anticorps spécifiques peut s'avérer utile pour définir les sérotypes.

***Épreuves sérologiques :** des kits ELISA commercialisées peuvent être utilisées pour le suivi de la réponse humorale. Les antigènes de ces kits donnent des réactions croisées entre les sérotypes et permettent des suivis des réponses sérologiques après vaccination et après épreuves virulentes de terrain notamment chez les jeunes poulets. Du fait des infections multiples et des vaccinations, les sérums des reproducteurs et des pondeuses contiennent des anticorps non spécifiques et, le diagnostic sérologique sur la base de l'IHA ne peut être utilisé avec un degré élevé de confiance.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *on peut utiliser des vaccins à virus vivants atténués et des vaccins à virus inactivés adjuvés huileux. Les vaccins à virus vivants, atténués par passage en série sur œufs embryonnés ou par traitement thermique, confèrent une meilleure immunité locale au niveau du tractus respiratoire que les vaccins inactivés. Certains vaccins à virus vivants présentent le risque d'un pouvoir pathogène résiduel associé à une réversibilité de l'atténuation vaccinale dans les élevages. Cependant, la vaccination de masse avec des vaccins à virus vivants ne présente généralement pas de danger.*

Les vaccins à virus inactivés doivent être administrés individuellement et une simple inoculation n'est pas protectrice si elle n'est pas précédée par l'administration d'un ou de plusieurs vaccins à virus vivant. Ces deux types de vaccins sont disponibles en association avec le vaccin contre la maladie de Newcastle. Dans certains pays, des vaccins multivalents à virus inactivés comprenant les valences maladie de Newcastle, maladie de Gumboro, réovirose et « syndrome chute de ponte 76 » sont disponibles.

A. INTRODUCTION

La bronchite infectieuse aviaire (BI) a été décrite pour la première fois aux États-Unis d'Amérique (USA) dans les années trente en tant que maladie respiratoire aiguë touchant surtout les jeunes poulets. Le virus découvert par la suite fut appelé virus de la bronchite infectieuse aviaire (VBI). Le VBI est un membre du genre *Coronavirus*, famille des *Coronaviridae*, de l'ordre des Nidovirales. Le VBI et d'autres coronavirus aviaires du dindon et du faisan sont classés dans le groupe 3 des coronavirus, avec les coronavirus des mammifères qui comprennent les groupes 1, 2 et 4 (le groupe 4 est le coronavirus le plus récemment identifié comme responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (6). Les coronavirus sont non-segmentés, de sens positif, avec un génome comprenant un simple brin d'ARN.

Le VBI affecte les poulets de tous âges qui, à part les faisans (10), sont les seules espèces connues affectées naturellement. La maladie se transmet par voie aérienne, directement par contact entre poulets ou indirectement par transmission mécanique (matériel de poulailler ou de conditionnement des œufs contaminé, fumier utilisé comme engrais, visites de fermes, etc.). La BI est rencontrée dans le monde entier sous différentes formes cliniques, la principale étant une maladie respiratoire qui se développe lors d'une infection du tractus respiratoire après inhalation ou ingestion. L'infection de l'oviducte peut provoquer des lésions irréversibles chez les jeunes poulettes. Chez les oiseaux plus âgés, on observe un arrêt de la ponte ou la production d'œufs à coquille mince ou déformée et décolorée. La BI peut provoquer des troubles rénaux avec une néphrite aiguë, une urolithiase, et une mortalité (11). Après une amélioration apparente, une néphrite chronique peut provoquer une mort subite un peu plus tard. Une maladie du proventricule due au VBI a aussi été décrite (49). Les souches sauvages et vaccinales peuvent persister dans les amygdales caecales du tractus intestinal et peuvent être excrétées dans les fientes pendant des semaines voire plus longtemps encore chez les oiseaux apparemment sains (2). Pour une synthèse approfondie de la bronchite infectieuse, voir Cavanagh & Naqi (11). Une étude détaillée de l'antigène du VBI, du génome et des tests de détection par De Witt (24) est aussi disponible.

Il n'a jamais été observé une infection humaine avec le VBI.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La confirmation du diagnostic est obtenue par la mise en évidence de l'antigène viral, parfois associée à l'examen sérologique. L'emploi généralisé de vaccins atténués ou inactivés peut compliquer le diagnostic utilisant des méthodes sérologiques car les anticorps d'origines vaccinale et sauvage ne peuvent pas être toujours distingués. La persistance d'un vaccin à virus vivant peut aussi compliquer les essais d'isolement de l'agent causal.

1. Identification de l'agent pathogène

a) Prélèvements

Les prélèvements sur les oiseaux doivent se rapporter à la maladie suspectée et être effectués dès l'apparition des symptômes. Les échantillons doivent être conditionnés dans des milieux de transport sous froid et congelés dès que possible. La chaîne du froid de l'élevage au laboratoire doit être maintenue. Dans le cas d'une maladie respiratoire aiguë, des écouvillons du tractus respiratoire supérieur des oiseaux vivants ou des prélèvements de trachée et de poumons des oiseaux malades doivent être récoltés et conservés dans un milieu de transport comportant de la pénicilline (10 000 unités internationales [UI]/ml) et de la streptomycine (10 mg/ml) et maintenus sous glace ou congelés. Chez des oiseaux atteints de néphrite ou

de troubles de la ponte, les prélèvements doivent concerner les reins ou l'oviducte en plus des prélèvements de l'appareil respiratoire. Dans certains cas, on peut souhaiter réaliser l'identification du VBI sans isolement du virus. Dans ce cas, des écouvillons du tractus respiratoire ou du cloaque peuvent être envoyés directement sans être conservés dans un milieu de transport (8). Lors de suspicion de néphrite due à la BI, des échantillons de reins doivent être effectués sur des carcasses de poulets récemment euthanasiés pour l'examen histopathologique ou isolement du virus. Les prélèvements sanguins d'oiseaux atteints d'une forme aiguë ou d'oiseaux convalescents doivent aussi faire l'objet d'un examen sérologique. Un pourcentage élevé d'isolements réussis du virus a été rapporté des amygdales caecales ou des fèces (2). Cependant, les isolats à partir du tractus intestinal peuvent ne pas être en relation avec l'infection la plus récente ou avec la maladie clinique. L'isolement du VBI peut être facilité par l'emploi de poulets exempts d'agents pathogènes spécifiques (EAPS ou SPF pour *specific pathogen free*) utilisés comme sentinelles à plusieurs reprises dans des élevages industriels (25).

b) Culture

Des suspensions de prélèvements tissulaires diluées (10 à 20 /100 ml soit 10 à 20 %) sont préparées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) ou un milieu nutritif pour inoculation à l'œuf ou un milieu de culture utilisé pour les cultures d'anneaux trachéaux (CAT) (17). Les suspensions sont clarifiées par centrifugation lente et filtration sur des filtres bactériens (0,2 µ) avant inoculation sur œuf ou sur CAT.

Les œufs embryonnés de poulet et les CAT sont largement utilisés pour effectuer les isolements primaires du virus. Les cultures cellulaires ne sont pas recommandées pour l'isolement primaire car il est souvent nécessaire d'adapter les isolats du VBI sur les œufs embryonnés avant d'observer un effet cytopathogène (ECP) de l'infection virale sur des cellules embryonnaires de rein de poulet.

Les œufs embryonnés utilisés pour isolement du virus doivent provenir de préférence de poulets EAPS ou de reproducteurs n'ayant jamais été infectés ou vaccinés. Le plus souvent, 0,1 à 0,2 ml du surnageant de l'échantillon est inoculé dans la cavité allantoïdienne d'embryons âgés de 9 à 11 jours. Les œufs sont ensuite mirés tous les jours pendant 7 jours et toute mortalité survenant dans les 24 h doit être considérée comme non spécifique et les œufs sont éliminés. Habituellement, l'inoculum initial n'a pas d'effets macroscopiques visibles sur l'embryon, sauf s'il s'agit d'une souche vaccinale déjà adaptée à l'œuf. Normalement, les liquides allantoïdiens de tous les œufs, récoltés 3 jours après l'inoculation, sont mélangés. Ce mélange est dilué au 1/5 ou au 1/10 dans un milieu additionné d'antibiotiques en vue d'un nouveau passage sur d'autres œufs jusqu'à un maximum de 3 à 4 passages. En règle générale, une souche sauvage induit des lésions visibles sur l'embryon (embryons chétifs, rabougris avec dystrophie des plumes et des dépôts d'urate dans le mésonéphros rénal) du deuxième au quatrième passage. Aux passages suivants, on peut observer une mortalité embryonnaire au fur et à mesure que la souche s'adapte à la culture sur œuf. D'autres virus, notamment des adénovirus qui sont souvent retrouvés dans les tractus respiratoire, peuvent aussi provoquer des lésions similaires au VBI. Le liquide allantoïdien ne doit pas agglutiner les hématies et l'isolement du VBI doit être confirmé par typages sérologique et génotypique. Les liquide allantoïdiens infectieux sont conservés à –20 °C ou moins pour une courte durée de conservation, ou à –60 °C pour une conservation longue ou, enfin, à 4 °C après lyophilisation.

Les CAT préparés à partir d'embryons âgés de 20 jours peuvent être utilisés directement pour isoler le VBI à partir d'échantillons du terrain (17). Un système de coupe automatique est nécessaire pour obtenir des sections transversales adéquates pour cette technique (21). Les anneaux doivent avoir 0,5 à 1 mm d'épaisseur et doivent être maintenus dans un milieu d'Eagle's N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES) sur tubes tournants (15 tours/mn) à 37 °C. L'infection de ces cultures de trachées se traduit par une ciliostase en 24 à 48 h. La ciliostase peur être produite par d'autres virus et la suspicion d'un cas de BI doit être confirmée par des tests sérologiques ou génotypiques.

c) Méthodes d'identification

Les premiers tests effectués sur les isolats de VBI ont pour but d'éliminer les autres virus. Les membranes chorio-allantoïques des œufs infectés sont récoltées, homogénéïsées et testées pour les adénovirus aviaires du groupe 1 par immunodiffusion ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Les infections des élevages industriels par les adénovirus aviaires du groupe 1 sont fréquentes et les lésions produites sur les embryons ne sont pas distinguables de celles dues au VBI. En outre, les liquides allantoïdiens récoltés n'entraînent pas l'hémagglutination des globules rouges de poulet. Les méthodes moléculaires (RT-PCR [transcription inverse couplée à une PCR] ou RT-PCR suivie d'une RFLP [analyse du polymorphisme des fragments de restriction]) sont utilisées fréquemment pour identifier un isolat de VBI. D'autres techniques peuvent aussi être utilisées : les cellules présentes dans le liquide allantoïdien des œufs infectés peuvent être testées en immunofluorescence pour la recherche de l'antigène du VBI (12), et l'examen direct en microscopie électronique en contraste négatif permet de révéler les particules virales ayant l'aspect caractéristique des coronavirus dans les liquides allantoïdiens ou le milieu de culture des CAT

après concentration. La présence du VBI dans le liquide allantoïdien peut être détectée par amplification avec la RT-PCR et l'emploi d'une sonde ADN dans un test dot-hybridation (32). Le marquage direct par immunofluorescence des CAT permet une détection rapide du VBI (3). L'immunohistochimie, avec l'emploi d'anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques de groupe peut aussi permettre d'identifier le VBI sur les membranes chorioallantoïdiennes infectées (43).

d) Identification des sérotypes

La variation antigénique entre les souches du VBI sont très fréquentes (11, 16, 23, 28, 31), mais il n'existe pas actuellement de classification définitive sur laquelle tout le monde s'accorde. Néanmoins les relations et les différences antigéniques entre les souches sont importantes car les vaccins basés sur un sérotype particulier peuvent n'offrir qu'une faible protection, voire pas de protection du tout, vis-à-vis d'un groupe antigéniquement différent. Du fait de l'émergence régulière de variants antigéniques, les virus et, par conséquent les aspects de la maladie et les vaccins utilisés, peuvent être tout à fait différents selon la région géographique. Un contrôle permanent des virus sur le terrain est nécessaire pour la production de vaccins efficaces face à la survenue de variants antigéniques. Le sérotypage des isolats de VBI et des souches a été effectué avec les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (1, 36), et de séroneutralisation (SN) sur embryons de poulet (23), sur CAT (22) et sur cultures cellulaires (29). La neutralisation des foyers immunofluorescents a été aussi utilisée pour différentier les souches (19).

Des anticorps monoclonaux (AcM), utilisés habituellement avec la méthode immuno-enzymatique (ELISA), sont utiles pour différencier les souches et les groupes du VBI (30, 38). Les limites dans leur utilisation pour définir le sérotype du VBI sont liées au manque d'AcMs ou d'hybridomes et à la nécessité de produire de nouveaux AcMs avec une bonne spécificité permettant de suivre le nombre toujours en augmentation des sérotypes variants émergents de la BI (34).

e) Identification du génotype

Le génotypage par RT-PCR a largement remplacé le sérotypage par IHA et SN pour déterminer l'identité des souches sauvages. Les bases moléculaires de la variation antigénique ont été examinées, généralement par le séquençage du nucléotide du gène codant la protéine des spicules (S) ou, plus spécifiquement le gène codant la sous-unité S1 de la protéine S (5, 40) où le plus grand nombre d'épitopes identifiés par des anticorps neutralisants est observé (39). On n'observe pas une corrélation exacte avec les résultats de l'IHA ou de la SN dans la mesure où si d'un côté les différents génotypes présentent généralement de grandes différences (20 à 50 %) dans les séquences d'acides aminés de la sous-unité S1 (40), des virus autres qui sont clairement différenciables par séroneutralisation ne présentent seulement quant à eux que 2 à 3 % de différences dans les séquences d'acides aminés (5). Cependant, les résultats obtenus avec la séquence S1 en comparaison avec le sérotype identifié par séroneutralisation permettent de sélectionner les souches vaccinales sur la base des données fournies par le séquençage.

Le premier avantage des techniques moléculaires est leur rapidité et leur capacité à détecter une grande variété de génotypes selon les tests employés. La RT-PCR RFLP distingue les différents sérotypes de VBI sur la base des profils de bandes uniques obtenus par électrophorèse des fragments de restriction obtenus par digestion enzymatique de S1 après amplification du gène par RT-PCR (33, 41). La méthode RT-PCR RFLP peut être utilisée en association avec une sonde marquée à la biotine pour détecter au préalable le VBI dans les liquides récoltés à partir d'œufs inoculés avec des échantillons cliniques (32). La RT-PCR RFLP peut identifier tous les sérotypes connus de VBI, ainsi que les variants.

La RT-PCR spécifique de génotype S1 peut identifier tous les sérotypes du VBI (35). Les amorces du gène S1 spécifiques pour les sérotypes Massachusetts (Mass), Connecticut, Arkansas, et JMK sont utilisées en association avec une paire d'amorces universelles qui amplifie tous les sérotypes de VBI. Les amorces pour les sérotypes DE/072/92 et Californie ont aussi été mises au point. Les autres sérotypes variants peuvent être reconnus comme étant des VBI en employant les amorces classiques, mais le sérotype ne peut pas être déterminé. Les infections multiples dues à plusieurs sérotypes de VBI peuvent être diagnostiquées.

Le séquençage des nucléotides d'un fragment significatif au plan diagnostic du gène S1 représente la technique la plus utile pour différencier les souches du VBI, et est devenue la méthode de choix dans de nombreux laboratoires. Le séquençage a aussi permis d'observer qu'il se produisait souvent une recombinaison entre les souches de VBI (7, 50). Il est possible d'utiliser le séquençage du produit de la RT-PCR (partie terminale hypervariable de S1) à des fins diagnostiques pour identifier les isolats ou les variants sauvages reconnus auparavant comme VBI (37). L'analyse et la comparaison des séquences de variants et d'isolats sauvages inconnus avec les souches de référence pour vérifier leur degré de parenté sont des avantages importants du séquençage.

Récemment, il a été montré que les coronavirus isolés de dindons et de faisans étaient génétiquement similaires au VBI, avec approximativement 90 % d'homologie pour les nucléotides situés dans la région II

hautement conservée de la région 3' non traduites du génome du VBI (9, 10). Le rôle possible de ces coronavirus dans les infections à VBI n'a pas été déterminé.

L'emploi essentiel des tests de RT-PCR est l'identification du virus et les études épidémiologiques lors de foyers de BI. Cependant, les tests actuels de RT-PCR ne donnent pas d'informations sur le pouvoir pathogène des virus.

- **Protocole de la RT-PCR**

i) *Extraction de l'ARN viral*

Toute méthode d'extraction de l'ARN peut être utilisée. De nombreux protocoles sont publiés dans des revues, des livres et sur le web. Cependant, pour extraire de grandes quantités d'ARN à partir du liquide allantoïdien, il est recommandé d'employer le kit Qiagen Viral RNA Mini Kit (www.qiagen.com). De son côté, le kit Qiagen RNeasy Mini Kit est recommandée pour extraire l'ARN du VBI à partir de tissus ou d'écouvillons. Tous les ARN extraits doivent être conservés entre –20 °C et –80 °C jusqu'au moment de l'analyse. Pour de longues durées, la conservation de l'ARN à –80 °C est recommandée.

ii) *Oligonucléotides personnalisés*

Des oligonucléotides personnalisés peuvent être achetés auprès de tous les fournisseurs. La société Operon (www.operon.com) produit depuis des années des oligonucléotides de qualité. Le gène cible pour la caractérisation du VBI est la sous-unité S1 du gène de la glycoprotéine des spicules. Une paire d'amorces fréquemment utilisée pour l'amplification de diverses souches de VBI est : S15' mod (sens) : 5'-TGA-AAA-CTG-AAC-AAA-AGA-3' et CK2 (anti-sens) : 5'-CNG-TRT-TRT-AYT-GRC-A-3' (26). Le produit de l'amplification avec S15'mod/CK2 a une longueur d'environ 700 pb commençant au début du gène S1 et s'étendant aux deux régions hypervariables utilisées pour le génotypage.

iii) *Technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase*

De nombreux kits de RT-PCR (à un ou deux temps) sont disponibles dans le commerce chez des fournisseurs qui garantissent sensibilité et fiabilité. Le kit recommandé est le kit en deux temps de Applied Biosystems (http://www.appliedbiosystems.com). La transcription inverse est effectuée selon les instructions du fournisseur. L'amorçage pour la RT est réalisé en utilisant des hexamères fournis avec le kit ou l'amorce de la PCR inverse, dans ce cas il s'agit de l'amorce CK2 (35). Les paramètres d'un cycle d'amplification sont les suivants : 25 °C pendant 10 min, 42 °C pendant 25 min, 95 °C pendant 5 min et maintien à 4 °C. Le volume total pour la réaction de transcription inverse est ajouté au mélange d'échantillon. Les paramètres de la PCR sont : 95 °C pendant 2 min, 45 cycles à 95 °C pendant 30 s, 52 °C pendant 30 s, 68 °C pendant 30 s, extension finale à 68 °C pendant 12 min et maintien à 4 °C. Les échantillons sont concentrés dans un dessicateur une nuit ou avec une centrifugeuse sous vide. Les échantillons desséchés sont remis en suspension dans 12 µl d'eau traitée au DEPC et 6 µl au tampon d'électrophorèse, avant électrophorèse sur un gel à 1,8 % d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Les gels sont visualisés sous lumière ultra-violette. Les bandes sont comparées à une échelle commercialisée (degrés de 100 pb) et à un témoin positif VBI.

iv) *Séquençage du gène S1*

Les bandes visualisées sur le gel d'agarose qui ont la même taille que celles du témoin positif sont découpées. Le produit de PCR est séparé du gel grâce au kit Qiagen Gel Extraction kit (www.qiagen.com) ou tout autre kit d'extraction du commerce. Les produits de PCR purifiés sont déposés sur un nouveau gel (1,8 % d'agarose et bromure d'éthidium) pour déterminer la quantité de produit disponible. Environ 20 µl (10 ng/µl) de produit de PCR sont nécessaires pour le séquençage. Le séquençage peut être effectué au Centre de séquençage de l'Université du Delaware (University of Delaware Sequencing & Genotyping Center, Newark, DE [http://www.udel.edu/dnasequence]) ou dans tout autre établissement. Les chromatogrammes des séquences sont analysés en utilisant le logiciel DNAStar analysis ou en ligne :

http://www.mekentosj.com/4peaks/, ou http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

Les séquences éditées des isolats de VBI sont caractérisées à l'aide de BLASTn pour l'analyse des nucléotides ou BLASTp pour celle des protéines (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2. Épreuves sérologiques

De nombreuses épreuves ont été décrites. Les épreuves considérées dans cette partie comprennent la séroneutralisation (SN) (23), l'immunodiffusion en gélose (IDG) (48), l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (1) et la technique ELISA (42). Chaque épreuve présente des avantages et des inconvénients dans les domaines de la pratique, de la spécificité, de la sensibilité et du coût. En général, pour les épreuves sérologiques de routine, les tests de SN sont trop coûteux et peu pratiques et l'épreuve d'IDG manque de sensibilité. Les tests d'IHA et ELISA conviennent le mieux aux recherches sérologiques de routine. Les tests ELISA sont utiles pour les suivis des expositions au VBI et peuvent détecter une réponse humorale dirigée contre tous les sérotypes. L'IHA, quand elle est réalisée sur des sérums de jeunes poulets (poulettes ou poulet de chair), peut donner des indications sur les

anticorps spécifiques de sérotype de l'élevage. Une surveillance sérologique régulière des élevages avec la recherche des anticorps BI représente une aide pour vérifier le niveau de réponse au vaccin ou à une épreuve virulente. Du fait que de nombreux sérums de poulet, en particulier d'oiseaux plus âgés, contiennent des anticorps pouvant montrer une réaction croisée importante avec des souches différentes antigéniquement, on ne peut retenir comme certainement fiable le diagnostic sérologique d'une suspicion clinique de BI.

a) Test de séroneutralisation

Pour les tests de SN tous les sérums doivent être préalablement chauffés à la température de 56 °C pendant 30 min. Le virus est mélangé avec du sérum et placé en incubation pendant 30 à 60 min à 37 °C ou à la température du laboratoire. On utilise le plus souvent des œufs embryonnés de poule, mais on peut aussi employer des cultures d'anneaux de trachée ou des cultures cellulaires. Deux méthodes ont été utilisées pour estimer le taux d'anticorps neutralisants. L'une emploie une concentration sérique constante réagissant avec des dilutions croissantes de virus (méthode alpha) et l'autre emploie un titre constant de virus et des dilutions croissantes de sérum (méthode bêta).

Dans la méthode alpha, des dilutions croissantes au $1/10^{e}$ du virus adapté à l'œuf sont ajoutées à une dilution fixe d'antisérum (habituellement au$1/5^{e}$) et chaque mélange est inoculé à un groupe de 5 à 10 œufs embryonnés. Le virus est titré parallèlement. La dose létale est calculée selon la méthode de Kärber ou celle de Reed et Muench. Les résultats sont exprimés en index de neutralisation représentant la différence logarithmique (log_{10}) entre le titre du virus et celui des mélanges virus/antisérum. La valeur de l'index de neutralisation peut atteindre 4,5 à 7,0 dans le cas d'un mélange homologue virus/antisérum ; une valeur inférieure à 1,5 n'est pas spécifique mais un index de 1,5 peut être rencontré avec un virus hétérologue.

La méthode bêta est la plus utilisée pour le test de séroneutralisation sur œufs embryonnés. Des dilutions croissantes d'antisérum (au 1/2 ou au 1/4) sont ajoutées à un même volume de virus à dilution constante, généralement titrant 100 ou 200 DIE_{50} (dose de virus infectant 50 % des embryons) par 0,05 ml et 0,1 ml de chaque mélange est inoculé dans la cavité allantoïque de chacun des 5 à 10 œufs embryonnés utilisés. Un contrôle du titre du virus est pratiqué simultanément pour vérifier que le titre de la dilution de la solution virale reste compris entre $10^{1,5}$ et $10^{2,5}$ DIE_{50}. La dose létale est calculée selon la méthode de Kärber ou celle de Reed et Muench comme précédemment, mais les dilutions sont exprimées en logarithme de base 2 (log_2). Cette méthode bêta (virus constant/sérum variable) est aussi employée dans les tests de neutralisation sur cultures de trachées avec l'emploi de 5 tubes par dilution de sérum selon les méthodes classiques de virologie (22). Les résultats sont calculés selon la méthode Reed et Muench, et le titre du virus est exprimé en doses ciliostatiques moyennes par unité de volume (log_{10} DC_{50}). Les titres sériques sont aussi exprimés réciproquement en logarithme de base 2 (log_2). Ce test est plus sensible que les autres, mais les difficultés techniques rencontrées pour sa mise en œuvre ne permettent pas son utilisation en pratique courante.

b) L'inhibition de l'hémagglutination

Un protocole standard pour le test d'IHA pour le VBI a été décrit (1) et la méthode décrite ci-dessous est basée sur ce test standard. Des souches ou des isolats du VBI peuvent agglutiner les hématies de poulets (HP) après un traitement enzymatique (neuraminidase) (44, 45). La souche utilisée pour produire l'antigène peut varier selon le diagnostic souhaité. L'antigène pour le test IHA est préparé à partir de liquides allantoïques infectés par le VBI.

Les tests d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination sont réalisés à 4 °C.

- **Test d'hémagglutination**

i) Distribuer 0,025 ml d'un tampon PBS isotonique, pH 7,0 à 7,4, dans chaque puits d'une microplaque à fond en U ou en V en matière plastique ;

ii) Placer 0,025 ml de l'antigène viral dans le premier puits. Pour une délimitation plus précise du contenu hémagglutinant, il faut faire des séries de dilutions initiales rapprochées comme au 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc. ;

iii) Préparer des dilutions de l'antigène viral de 2 en 2 d'un volume de 0,025 ml dans toute la plaque ;

iv) Distribuer de nouveau 0,025 ml du tampon PBS dans chaque puits ;

v) Distribuer 0,025 ml de la suspension, d'hématies de poulet à 1 % (v/v) dans chaque puits ;

vi) Mélanger en remuant doucement la microplaque et laisser les hématies se déposer pendant 40 min à 4 °C, lorsque le témoin « hématies de poulet » est stabilisé en présentant une pastille distincte ronde ;

vii) L'HA est déterminée en inclinant la plaque et en observant la présence ou l'absence de l'hémagglutination (aspect en « larme » des hématies qui coulent). Le titrage doit être lu à la plus haute dilution pour laquelle se produit une hémagglutination complète soit une HA à 100 % représentant l'unité hémagglutinante (UHA). Cela peut être calculé avec précision à partir des séries initiales de dilution.

- **Test d'inhibition de l'hémagglutination**

Le test d'IHA est utilisé pour le diagnostic et pour les programmes de surveillance de la réponse vaccinale des élevages.

i) Distribuer 0,025 ml de PBS dans chaque cupule d'une plaque à fond en U ou en V ;

ii) Placer 0,025 ml de sérum dans la première cupule de la plaque ;

iii) Effectuer des dilutions de 2 en 2 de 0,025 ml de volume de sérum dans la microplaque ;

iv) Ajouter 0,025 ml contenant 4 unités hémagglutinantes d'antigène viral dans chaque cupule et attendre 30 min ;

v) Ajouter 0,025 ml d'une suspension d'hématies de poulet à 1 % (v/v) dans chaque cupule et, après avoir mélanger doucement, laisser les hématies se déposer pendant environ 40 min alors que les hématies témoins se déposent en présentant un bouton rond très net ;

vi) Le titre du test d'IHA correspond à la plus haute dilution de sérum provoquant une complète inhibition de 4 unités hémagglutinantes de l'antigène viral. L'agglutination est appréciée plus exactement en inclinant les plaques. Seules les cupules où les hématies se déposent de façon identique que dans les cupules témoins (contenant seulement 0,025 ml de la suspension d'hématies et 0,05 ml de PBS) doivent être considérées comme ayant montré une inhibition ;

vii) La validité des résultats doit être appréciée à l'aide d'un sérum témoin négatif qui ne devra pas présenter un titre $>2^2$, et un sérum témoin positif dont le titre devra être égal au titre connu à plus ou moins une dilution près ;

viii) Les sérums sont habituellement considérés comme positifs s'ils présentent un titre égal ou supérieur à 2^4. Cependant, il faut noter que parfois dans les élevages EAPS, une très faible proportion d'oiseaux peut présenter un titre non spécifique de 2^4, mais habituellement ces oiseaux sont âgés de plus de 1 an.

c) Méthode immuno-enzymatique

La technique ELISA est une méthode sérologique sensible, précoce et donnant les taux d'anticorps les plus élevés par comparaison avec les autres épreuves (42). Elle n'est pas spécifique d'une souche ou d'un type, mais elle est appropriée pour le contrôle de la réponse vaccinale sur le terrain. Des kits de diagnostic ELISA existent dans le commerce – ils sont basés sur différentes stratégies de détection des anticorps dirigés contre le VBI. Habituellement de tels kits ont été évalués et validés par le fabricant et il importe de suivre scrupuleusement les instructions du mode d'emploi. Le test ELISA est largement utilisé pour identifier les élevages de poulets infectés par le virus BI et présentant un titre important. Si la BI réapparaît dans un autre élevage de cette ferme, il faut tenter d'isoler le virus pour ensuite le génotyper par RFLP ou par séquençage S1.

d) Immunodiffusion en gélose (IDG)

L'IDG peut être utilisée pour le diagnostic de la BI (48). L'antigène est préparé à partir d'un homogénat de membranes chorioallantoïques d'embryons de poulets infectés. La souche Beaudette létale pour l'embryon est souvent utilisée pour produire l'antigène. Le test manque de sensibilité et risque de donner des résultats inégaux car la présence et la persistance des anticorps précipitant chez les oiseaux varient selon les individus.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Tous les virus des vaccins à virus vivants ou inactivés doivent être autorisés. Les souches utilisées dans les vaccins à virus vivants nécessitent généralement une atténuation. Actuellement de nombreux pays n'autorisent que des vaccins à virus vivants préparés à partir du type Massachusetts comme la souche H 120. Certains pays peuvent aussi autoriser des vaccins à virus vivants avec d'autres souches comme les souches Connecticut, Arkansas ou Delaware 072 (Etats-Unis d'Amérique) ou la souche 4/91 (Royaume-Uni). Les vaccins à virus vivants peuvent être utilisés en aérosols, dans l'eau de boisson ou par administration oculaire.

L'efficacité d'un vaccin inactivé dépends en grande partie d'une primovaccination avec un (ou des) vaccin(s) à virus vivant. Les vaccins à virus inactivés sont administrés individuellement aux oiseaux par une injection intramusculaire ou sous-cutanée. Les souches variantes doivent être utilisées dans la préparation d'auto-vaccins à virus inactivés pour le contrôle de la BI dans les élevages de poules pondeuses ou de reproducteurs.

Les vaccins à virus vivants confèrent une meilleure immunité locale au niveau du tractus respiratoire et permettent une protection contre un large spectre de souches du terrain (18). Cependant, les vaccins à virus vivants ne peuvent protéger les élevages de pondeuses pendant toute leur vie économique en raison de risque important de survenue de sérotypes variants dans des élevages d'âges variables et les baisses du taux de ponte dès l'âge de 40 semaines n'est pas rare (27). Certains vaccins à virus vivants présentent un effet pathogène résiduel provoquant une réaction vaccinale dans l'élevage. Cependant les recommandations concernant le mode d'administration de masse du vaccin (par aérosol ou eau de boisson) à l'élevage, en évitant l'emploi de doses vaccinales insuffisantes, doivent être suivies scrupuleusement si l'on veut protéger de façon satisfaisante tout l'élevage et pour éviter les retours à la virulence. Par ailleurs, l'emploi des vaccins en suivant scrupuleusement les doses recommandées par le fabricant est aussi une précaution pour éviter la réversion qui peut être causée par des doses fractionnées.

Il existe des perspectives de production pour des vaccins génétiquement modifiés (4) et pour une vaccination *in ovo* (47).

Les lignes directrices pour la fabrication de vaccins vétérinaires sont fournies dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices exposées ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont de nature générale. Dans chaque pays où ces vaccins BI sont fabriqués, les normes nationales et internationales doivent être respectées. L'autorité qui délivre les autorisations doit apporter des informations et un avis sur les critères requis. De nos jours, ceux-ci sont souvent présentés en termes généraux pour toute demande que ce soit pour des vaccins – aviaires et mammaliens – à virus vivants ou à virus inactivés, et pour des antiviraux ou antibactériens. Ils doivent aussi satisfaire à tous les critères applicables aux vaccins BI. Pour exemple, se reporter aux réglementations européenne et américaine (13-15, 46).

Les listes des agents étrangers qui doivent être absents continuent à s'allonger. Les producteurs doivent être familiers avec celles qui sont appliquées dans leur pays. Récemment, le virus de la néphrite aviaire et le pneumovirus aviaire ont été ajoutés.

Pour les vaccins BI, on peut rencontrer des différences importantes concernant les épreuves infectieuses pour les tests d'activité et leur validation. Traditionnellement on utilise la souche virulente M-41 du type Massachusetts (Mass 41) pour ces épreuves infectieuses à la fois pour les vaccins à virus vivants et à virus inactivés. Bien que ce type soit encore commun, il n'est plus le seul utilisé ni le principal dans plusieurs pays et il peut être recommandé de préparer des vaccins avec les autres types. Il est logique de réaliser les épreuves infectieuses avec le type de virus présent dans le vaccin. Il est plus difficile d'établir des critères pour la validation d'épreuves infectieuses avec les types non-Massachusetts en raison de leur plus faible virulence en général. Les vaccins à virus inactivés sont destinés à protéger contre les chutes du taux de ponte. L'épreuve classique avec la souche M-41, décrite dans ce chapitre, doit provoquer une chute d'au moins 67 % chez les témoins non vaccinés, mais des taux de chute beaucoup plus bas observés avec d'autres types doivent être considérés comme satisfaisants, en fonction des effets connus et publiés de ces souches sur le terrain. On observe une tendance à assouplir les critères des épreuves infectieuses avec le type Massachusetts et la Pharmacopée européenne définit maintenant une chute de ponte d'au moins 35 % pour les types Massachusetts et d'au moins 15 % pour les types non-Massachusetts lorsque la chute correspond à des données reposant sur des preuves documentées (15).

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Le lot de semence (semence primaire) doit être utilisé pour tous les types de vaccins produits et pour les souches d'épreuve. Chaque virus est dénommé selon la souche, son origine et doit être exempt de toute contamination par d'autres souches de virus BI ou par tout agent contaminant. Les souches de virus destinées aux vaccins ou aux épreuves infectieuses doivent être entreposées séparément.

Pour les vaccins à virus vivants, plusieurs pays n'acceptent que les souches de type Massachusetts. Quelques pays autorisent d'autres souches, généralement celles déjà présentes dans les élevages du pays. L'incorporation d'un type antigénique dans les vaccins à virus à la fois vivants et inactivés doit être justifiée si l'on doute de son existence dans le pays.

b) Méthodes de culture

Toutes les souches virales de semence sont cultivées dans le sac allantoïdien d'embryons de poulets ou sur cultures cellulaires appropriées. Les œufs doivent provenir d'un élevage EAPS.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

- **Pureté**

Chaque lot de semence doit être exempt de toute contamination bactérienne, fongique, mycoplasmique ou virale.

Pour la détection des virus étrangers, la souche de semence est d'abord traitée avec un antisérum monospécifique de titre élevé contre la souche en cause ou contre un type connu. Le mélange est mis en culture de plusieurs manières pour confirmer l'absence de tout virus connu comme contaminant potentiel. L'antisérum ne doit pas comprendre d'anticorps dirigés contre les adénovirus, le virus de l'encéphalomyélite aviaire, le rotavirus aviaire, le virus de l'anémie infectieuse du poulet, le virus de la variole aviaire, le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire, le virus influenza A, le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la bursite infectieuse, les virus des leucoses aviaires, le réovirus, le virus de la maladie de Marek, l'herpesvirus du dindon, les virus associés aux adénovirus, le virus du syndrome chute de ponte 76 (EDS76), le virus de la néphrite aviaire, le pneumovirus aviaire ou le virus de la réticulo-endothéliose. L'inoculum ajouté dans chaque système de culture utilisé doit contenir une quantité de virus BI neutralisé dont l'infectiosité initiale doit être équivalente à au moins 10 fois la dose minimale du terrain. Ces systèmes sont :

1. des embryons de poulet EAPS âgés de 9 à 11 jours, inoculés à la fois dans le sac allantoïdien et sur la membrane chorioallantoïdienne (deux passages) ;

2. des cultures de fibroblastes d'embryon de poulet, pour les virus leucosiques des sous-groupes A et B. Le test de fixation du complément pour la leucose aviaire (test COFAL) ou le test ELISA en double sandwich pour les antigènes leucosiques spécifiques de groupe est réalisé sur des extraits cellulaires récoltés à 14 jours. Un test d'immunofluorescence pour le virus de la réticuloendothéliose est réalisé sur un tapis cellulaire, sur lamelles couvre-objet, après deux passages ;

3. des cultures de cellules rénales de poulets EAPS sont utilisées pour la recherche d'un effet cytopathogène, d'inclusions cellulaires ou d'agents hémadsorbants après des passages correspondant à un temps d'incubation total jamais inférieur à 5 jours et jusqu'à 20 jours ;

4. des poussins EAPS dont l'âge correspond à l'âge minimal recommandé pour la vaccination sont inoculés par la voie intramusculaire avec 100 doses vaccinales et par la voie conjonctivale avec 10 doses vaccinales. Ce test est répété 3 semaines plus tard : les poulets sont inoculés dans la voûte plantaire et par la voie intranasale avec 10 doses vaccinales. Ces poussins sont observés pendant au moins 6 semaines et leur sérum est testé pour la recherche de l'encéphalomyélite aviaire, de la bursite infectieuse, de la maladie de Marek, de la maladie de Newcastle et d'une infection par *Salmonella pullorum*.

- **Activité**

Les vaccins indiqués pour une protection contre les chutes du taux de ponte doivent être testés pour la durée de la réponse humorale. Les titres IHA doivent être en moyenne > 6 $\log_2$ jusqu'à l'âge de 60 semaines. Les épreuves sérologiques doivent être réalisées à des intervalles suffisamment fréquents pour démontrer qu'il n'y a pas eu un effet de rappel provoqué par un VBI extérieur.

Les vaccins indiqués pour la protection des poulets de chair et des poulets d'élevage contre la forme respiratoire de la maladie doivent être testés de la même manière pour la durée de la réponse immunitaire. Cette réponse est testée jusqu'à l'âge de l'abattage pour les poulets de chair et jusqu'à l'âge du rappel vaccinal (le plus souvent à l'âge de 16 à 18 semaines) dans le cas des poulets d'élevage.

- **Innocuité**

Les tests pratiqués sur la souche virale de semence doivent inclure un test sur le risque de retour vers la virulence. La souche de semence des vaccins à virus vivants et inactivés doit être testée pour son innocuité selon les recommandations de la Section C.4.b.

- **Efficacité**

Pour démontrer l'efficacité, un essai doit être réalisé avec des vaccins obtenus à partir du lot de semence primaire et du lot de travail après 5 passages à partir du lot de semence primaire. Ils sont soumis à des tests démontrant leurs effets protecteurs.

Pour les vaccins à virus vivants, au moins 10 poussins EAPS âgés de 3 à 4 semaines sont vaccinés par voie intranasale ou oculaire avec la dose recommandée. Dix poussins témoins non vaccinés du même âge sont gardés séparément. Tous les oiseaux des deux groupes sont éprouvés 3 à 4 semaines plus tard par

les voies intranasale ou oculaire, chacun recevant $10^{3,0}$–$10^{3,5}$ DIE_{50} de la souche virulente Massachusetts M-41. Un prélèvement par écouvillonnage de la trachée est pratiqué sur chaque oiseau 4 à 5 jours après l'épreuve et placé dans 3 ml d'un milieu de culture liquide avec antibiotiques. Chaque milieu est testé pour la recherche du VBI par inoculation (0,2 ml) de 5 œufs embryonnés âgés de 9 à 11 jours. Un autre test alternatif à ces écouvillonnages consiste à tuer les oiseaux 4 à 6 jours après l'épreuve et à examiner au microscope l'activité ciliaire des anneaux de trachée (20). Les oiseaux n'ayant pas résisté à l'épreuve présentent une perte importante de la motilité ciliaire. Les vaccins à virus vivants sont satisfaisants si au moins 90 % des poussins vaccinés et éprouvés ne montrent pas la présence du VBI dans leur trachée alors que 90 % ou plus des poussins témoins montrent la présence du virus.

Pour évaluer un vaccin à virus inactivé destiné à protéger des poules pondeuses, au moins 30 poussins EAPS sont vaccinés à la dose préconisée à l'âge le plus jeune recommandé pour cette vaccination. Si une primovaccination avec un vaccin à virus vivant est d'abord effectuée, un groupe supplémentaire d'oiseaux reçoit seulement le vaccin à virus vivant. Dans les deux cas, ces primovaccinations ne doivent pas être faites au delà de l'âge de 3 semaines. Le vaccin à virus inactivé est administré 4 à 6 semaines après la primovaccination avec le vaccin à virus vivant. Un autre groupe de 30 oiseaux témoins non-vaccinés est prévu parallèlement. Tous les groupes sont hébergés séparément jusqu'à 4 semaines avant le pic de la production des œufs puis ils sont réunis dans le même bâtiment. La production individuelle en œufs est surveillée et lorsqu'elle devient régulière tous les oiseaux sont éprouvés, la surveillance de la production d'œufs étant prévue encore pendant 4 semaines. L'épreuve doit être suffisante pour assurer une baisse du taux de ponte pendant les 3 semaines suivant l'intervention. La baisse du taux de ponte du groupe témoin doit être au moins de 67 %. Le groupe recevant le vaccin à virus vivant en primovaccination suivi d'un rappel avec le vaccin à virus inactivé doit rester au taux précédent et le groupe ne recevant que la primovaccination doit montrer un taux intermédiaire de baisse de la production. Les sérums collectés chez tous les oiseaux au moment de la vaccination, 4 semaines plus tard et au moment de l'épreuve doivent être négatifs chez les oiseaux témoins.

Pour évaluer un vaccin à virus inactivé destiné à protéger des oiseaux contre la maladie respiratoire, 20 poulets EAPS âgés de 4 semaines sont vaccinés selon les recommandations du fabricant. Un autre groupe de 20 oiseaux du même âge et de même origine est hébergé avec ce premier groupe. La réponse humorale est déterminée 4 semaines plus tard ; il ne doit pas y avoir de réponse immunitaire chez les oiseaux témoins. Tous les oiseaux sont éprouvés avec 10^3 DIP_{50} (Dose de virus infectant 50 % des poussins) de virus virulent, tués 4 à 7 jours plus tard et les sections de trachée sont examinées pour leur motilité ciliaire. Au moins 80 % des témoins non-vaccinés doivent présenter une ciliostase complète alors qu'un même pourcentage d'oiseaux vaccinés doit montrer qu'il n'a pas été affecté.

Des vaccins, à virus vivant comme à virus inactivé, contenant les valences maladie de Newcastle, bursite infectieuse, réovirose et syndrome chute de ponte 76 (RDS76) sont disponibles dans certains pays. L'efficacité de ces différentes valences vaccinales doit être établie indépendamment puis sur l'association au cas où il existerait une éventuelle interférence entre ces différents antigènes.

2. Méthodes de fabrication

Toutes les souches virales destinées aux vaccins à virus vivants sont cultivées dans le sac allantoïdien d'œufs embryonnés de poulets EAPS ou sur cultures cellulaires appropriées. Pour les vaccins à virus inactivés, les œufs de poules issues d'élevages non EAPS peuvent être utilisés. Le mélange récolté est clarifié puis titré pour son infectiosité. Pour les vaccins à virus vivants, ce liquide est lyophilisé dans des ampoules alors que pour les vaccins à virus inactivés il est mélangé à une huile minérale de haute qualité pour former une émulsion à laquelle un conservateur est ajouté.

3. Contrôle en cours de fabrication

Le contrôle du titre en antigène requis est basé sur les tests initiaux pratiqués sur les lots de vaccins prouvant leur efficacité dans des essais au laboratoire et sur le terrain. Les titres infectieux sont évalués sur des embryons de poulet.

Les vaccins à virus vivants ne doivent pas contenir moins de $10^{3,5}$ DIE_{50} par dose pour un oiseau jusqu'à la date d'expiration indiquée, et pas moins de $10^{2,5}$ DIE_{50} par dose pour un oiseau après une incubation à 37 °C pendant 7 jours à la fin de l'observation. Pour les vaccins à virus inactivés, le fabricant doit démontrer l'efficacité de l'inactivation de l'agent et du procédé d'inactivation à la fois pour le virus BI et les contaminants potentiels. Avec l'utilisation de la bêta-propiolactone ou du formol, tous les virus leucosiques vivants et toutes les espèces de *Salmonella* doivent être éliminés ; et, avec les autres agents utilisés pour l'inactivation, tous les contaminants potentiels doivent être inactivés. Avant les procédés d'inactivation, il est important de vérifier l'homogénéité des suspensions et le test d'inactivation doit être réalisé sur chaque lot récolté en vrac après inactivation et sur le produit fini.

Les tests d'inactivation doivent être appropriés au vaccin concerné et consistent à effectuer deux passages sur cultures cellulaires, sur œufs embryonnés ou sur poussins, en inoculant 0,2 ml et en renouvelant 10 fois par passage.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Chaque lot de vaccin à virus vivant doit être contrôlé pour l'absence de contamination comme pour le virus de semence (voir le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

- **Pour les vaccins à virus vivants**

Utiliser au moins 10 poulets EAPS ayant l'âge minimal requis pour la vaccination comme indiqué sur la notice du vaccin. Administrer par instillation oculaire à chaque poulet 10 doses de vaccin reconstitué de manière à obtenir une concentration adaptée à ce test. Observer les poulets pendant 21 jours. Pour les vaccins indiqués pour les poulets âgés de 2 semaines ou plus, utiliser les poulets inoculés dans « le test pour les agents étrangers utilisant les poulets » (voir Section C.1.c.4). Si, pendant la période d'observation, plus de 2 poulets meurent d'une cause non attribuable au vaccin, répéter le test. Le vaccin est satisfaisant pour ce test si les poulets ne présentent pas de signes cliniques graves, en particulier des signes respiratoires et qu'aucun poulet ne meure d'une cause attribuable au vaccin.

- **Pour les vaccins à virus inactivés**

Injecter une double dose de vaccin par la voie recommandée par le fabricant à chacun des 10 poulets EAPS âgés de 14 à 28 jours. Observer les poulets pendant 21 jours. Il faut vérifier qu'il n'y a aucune réaction anormale locale ou systémique.

c) Activité

Le test d'activité est établi à partir des résultats des tests d'efficacité réalisés sur le lot de semence primaire. Les tests d'activité des vaccins à virus vivants sont réalisés par le titrage de l'infectiosité et pour les vaccins à virus inactivés, ces tests consistent à mesurer la production d'anticorps. Le test d'activité du lot de vaccin à virus inactivé consiste à vacciner 20 poulets EAPS âgés de 4 semaines et à montrer que leur titre moyen par le test d'IHA n'est pas inférieur à 6 $\log_2$, 4 semaines plus tard.

d) Durée de l'immunité

Le vaccin doit montrer qu'il présente l'activité requise pour atteindre la durée d'immunité revendiquée à la fin de la durée de conservation.

e) Stabilité

Au moins 3 lots doivent être testés pour leur stabilité et doivent donner des résultats satisfaisants 3 mois au delà de la durée de conservation mentionnée.

La stabilité du vaccin à virus vivant doit être mesurée par le maintien d'un titre infectieux satisfaisant.

La stabilité du vaccin à virus inactivé est mesurée à des intervalles réguliers lors des tests d'efficacité des lots. La concentration du conservateur et la persistance de la durée de conservation doivent être vérifiées. Il ne doit pas exister de modifications physiques du vaccin et l'émulsion initiale doit être retrouvée après une rapide secousse.

f) Agents de conservation

Il y a un taux maximal dans les conditions d'emploi des antibiotiques, des agents de conservation ou des agents résiduels utilisés pour l'inactivation.

g) Précautions et mise en garde

Le virus BI n'est pas connu pour présenter un danger quelconque pour le personnel préparant les vaccins ou les testant. Cependant certains agents étrangers peuvent être nocifs et les premières étapes dans l'emploi du lot de semence doivent être réalisées dans un local sécurisé. Il s'agit de prendre la plus grande précaution dans toutes les productions de vaccins pour diminuer le risque d'exposition du personnel à des

aérosols de protéines étrangères. Les personnes allergiques aux œufs ne doivent pas être employées pour ce travail.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test d'innocuité doit être réalisé sur chaque lot du produit fini, comme indiqué dans la Section C.4.b.

b) Activité

Un test d'activité doit être réalisé sur chaque lot du produit fini, comme indiqué dans la Section C.4.c, chez le fabricant et à la fin de la période de conservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALEXANDER D.J., ALLAN W.H., BIGGS P.M., BRACEWELL C.D., DARBYSHIRE J.H., DAWSON P.S., HARRIS A.H., JORDAN F.T., MACPHERSON I., MCFERRAN J.B., RANDALL C.J., STUART J.C., SWARBRICK O. & WILDING G.P. (1983). A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.,* **113**, 64.

2. ALEXANDER D.J., GOUGH R.E. & PATTISON M. (1978). A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.,* **24**, 228–233.

3. BHATTACHARJEE P.S., NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1994). A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.,* **23**, 471–480.

4. CASAIS R., DOVE B., CAVANAGH D. & BRITTON P. (2003). A recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.*, **77**, 9084–9089.

5. CAVANAGH D. (1991). Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. *In:* Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauischholzhausen, Germany, June 1991, 147–160.

6. CAVANAGH D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.,* **32**, 567–582.

7. CAVANAGH D., DAVIS, P.J. & COOK J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol.,* **21**, 401–408.

8. CAVANAGH D., MAWDITT K., BRITTON P. & NAYLOR C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.,* **28**, 593–605.

9. CAVANAGH. D., MAWDITT K., SHARMA. M., DRURY S.E., AINSWORTH H.L., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathol.,* **30**, 355-368.

10. CAVANAGH D., MAWDITT K., WELCHMAN D. DE B., BRITTON P. & GOUGH R.E. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.*, **31**, 81–93.

11. CAVANAGH D. & NAQI S. (2003). Infectious bronchitis. *In:* Diseases of Poultry, 11th Edition. Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 101–119.

12. CLARKE J.K., MCFERRAN J.B. & GAY F.W. (1972). Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.,* **36**, 62–70.

13. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (Interim Publication Nov. 1993). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. Volume VII: Guidelines for the Testing of Veterinary Medicinal Products.

14. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1795–1796.

15. COUNCIL OF EUROPE (1997). European Pharmacopoeia, Third Edition. Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae inactivatum. Council of Europe, Strasbourg, France, 1745–1746.

16. COOK J.K.A. (1984). The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.,* **13**, 733–741.

17. COOK J.K.A., DARBYSHIRE J.H. & PETERS R.W. (1976). The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.,* 50, 109–118.

18. COOK J.K.A., ORBELL S.J., WOODS M.A. & HUGGINS M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.*, **28**, 477–485.

19. CSERMELYI M., THIJSSEN R., ORTHEL F., BURGER A.G., KOUWENHOVEN B. & LUTTICKEN D. (1988). Serological classification of recent infectious bronchitis virus isolates by the neutralisation of immunofluorescent foci. *Avian Pathol.*, **17**, 139–148.

20. DARBYSHIRE J.H. (1985). A clearance test to assess protection in chickens vaccinated against avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.,* **14**, 497–508.

21. DARBYSHIRE J.H., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1978). Growth comparisons of avian infectious bronchitis virus strains in organ cultures of chicken tissues. *Arch. Virol.,* **56**, 317–325.

22. DARBYSHIRE J.H., ROWELL R.G., COOK J.K.A. & PETERS R.W. (1979). Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.,* **61**, 227–238.

23. DAWSON P.S. & GOUGH R.E. (1971). Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.,* **34**, 32–39.

24. DE WITT J.J. (2000).Technical review. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, **29**, 71–93.

25. GELB J., JR., ROSENBERGER J.K., FRIES P.A., CLOUD S.S., ODOR E.M., DOHMS J.D. & JAEGER J.S. (1989). Protection afforded infectious bronchitis virus-vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. *Avian Dis.,* **33**, 764–769.

26. GELB J., JR., WEISMAN Y., LADMAN B.S. & MEIR R. (2005). S1 gene characteristics and efficacy of Vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996–2000). *Avian Pathol.,* **34**,194–203.

27. GELB J., JR., WOLFF J.B. & MORAN C.A. (1991). Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.,* **35**, 82–87.

28. HOFSTAD M.S. (1958). Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.,* **19**, 740–743.

29. HOPKINS S.R. (1974). Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates. *Avian Dis.*, **18**, 231–239.

30. IGNJATOVIC J., MCWATERS P. & GALLI L. (1991). Antigenic relationship of Australian infectious bronchitis viruses: analysis using polyclonal and monoclonal antibodies. *In:* Proceedings of the Second International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauischholzhausen, Germany, June 1991, 161–167.

31. IGNJATOVIC J. & SAPATS S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,* **19** (2), 493–508.

32. JACKWOOD M.W., KWON H.M. & HILT D.A. (1992). Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.,* **36**, 403–409.

33. JACKWOOD M.W., YOUSEF N.M.& HILT D.A. (1997). Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.,* **41**, 105–110.

34. KARACA K., NAQI S.A. & GELB J. JR (1992). Production and characterisation of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis.*, **36**, 903–915.

35. KEELER C.L., REED K.L., NIX W.A. & GELB J. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus (IBV) by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.,* **42**, 275–284.

36. KING D.J. & HOPKINS S.R. (1984). Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis.,* **28**, 727–733.

37. KINGHAM B.F., KEELER C.L. JR, NIX W.A., LADMAN B.S. & GELB J. JR (2000). Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis.,* **44**, 325–335.

38. KOCH G., HARTOG L., KANT A., VAN ROOZELAAR D. & DE BOER G.F. (1986). Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Israel J. Vet. Med.,* **42**, 80–97.

39. KOCH G., KANT A., COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (1992). Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. *J. Gen. Virol*., **73**, 591–596.

40. KUSTERS J.G., NIESTERS H.G.M., LENSTRA J.A., HORZINEK M.C. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1989). Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, **169**, 217–221.

41. KWON H.M., JACKWOOD M.W., & GELB J., JR. (1993). Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*., **37**, 194–202.

42. MOCKETT A.P.A. & DARBYSHIRE J.H. (1981). Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.,* **10**, 1–10.

43. NAQI S.A. (1990). A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.,* **34**, 893–898.

44. RUANO M., EL-ATTRACHE J. & VILLEGAS P. (2000). A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, **44**, 99–104.

45. SCHULTZE B., CAVANAGH D. & HERRLER G. (1992). Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a haemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology*, **189**, 792–794.

46. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) (1 January, 1994). Code of Federal Regulations. § 113. 327 Bronchitis Vaccine. US Government Printing Office, Washington, D.C., USA

    (http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/14mar20010800/edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/9cfr113.327.htm)

47. WAKENELL P.S., SHARMA J.M. & SLOCOMBE R.F. (1995). Embryo vaccination of chickens with infectious bronchitis virus: histologic and ultrastructural lesion response and immunologic response to vaccination. *Avian Dis*., **39**, 752–765.

48. WITTER R.L. (1962). The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. *Avian Dis.,* **6**, 478–492.

49. YU L., JIANG Y., LOW S., WANG Z., NAM S.J., LIU W. & KWANG J. (2001). Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis*., **45**, 416–424.

50. ZWAAGSTRA K.A., VAN DER ZEIJST B.A.M. & KUSTERS J.G. (1992). Rapid detection and identification of avian bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.,* **30**, 79–84.

*
* *